

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 7/02, 7/06, 7/08 A61K 39/12, G01N 33/569	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/14196 (43) Date de publication internationale: 22 juillet 1993 (22.07.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00026 (22) Date de dépôt international: 13 janvier 1993 (13.01.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/00294 14 janvier 1992 (14.01.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE MERIEUX S.A. [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BRUN, André [FR/FR]; 21, cours Aristide-Briand, F-69300 Caluire (FR). TARDY, Marie-Claude [FR/FR]; 39, rue de la Bannière, F-69003 Lyon (FR). VAGANAY, Alain [FR/FR]; 54, rue du Dr.-Ollier, F-69100 Villeurbanne (FR). VANDE-PUTTE, Joris [FR/FR]; Rue du Stade, F-38790 Diemoz (FR).	(74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, CZ, JP, SK, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>	
(54) Title: PREPARATION OF MYSTERY DISEASE VIRUS ANTIGENS AND VACCINES AND ANTIGENS AND VACCINES PRODUCED FOR THE PREVENTION OF THIS DISEASE (54) Titre: PREPARATION D'ANTIGENES ET DE VACCINS DE VIRUS DE LA MYSTERY DISEASE, ANTIGENES ET VACCINS OBTENUS POUR LA PREVENTION DE CETTE MALADIE (57) Abstract Process for isolating the Mystery Disease virus consisting in taking the organs of sick or infected pigs, grinding the sample and passing the fluid floating on the surface onto heterologous or homologous cells, then collecting said fluid. For the industrial production of the Mystery Disease virus, the virus is cultivated on sensitive heterologous or homologous cells. Purified Mystery Disease viral antigen preparations comprise living viral particles, attenuated or not, or inactivated particles or sub-unit antigens or antigens expressed by genetic recombination from isolated virus genes. The invention also concerns vaccines containing a vaccinating quantity of such antigen. (57) Abrégé Le procédé d'isolement du virus de la Mystery Disease comporte le prélèvement d'organes de porcs malades ou infectés, le broyage du prélèvement et des passages du surnageant de broyage sur des cellules sensibles hétérologues ou homologues, puis la récolte du surnageant. Pour la production industrielle du virus de la Mystery Disease, on cultive le virus sur des cellules sensibles hétérologues ou homologues. Les préparations d'antigène viral purifié de la Mystery Disease comprennent des particules virales vivantes, atténuées ou non, ou des particules inactivées ou des antigènes de sous-unités ou des antigènes exprimés par recombinaison génétique à partir de gènes du virus isolé. Vaccins contenant une quantité vaccinante d'un tel antigène.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CZ	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

5

10

Préparation d'antigènes et de vaccins de virus de la
Mystery Disease, antigènes et vaccins obtenus pour la
15 prévention de cette maladie.

La présente invention a trait à la préparation
d'antigènes et de vaccins de virus de la Mystery Disease,
ainsi qu'aux antigènes et aux vaccins obtenus.

20 La maladie dite Mystery Disease (M.D.) ou maladie
mystérieuse ou encore Porcine Reproductive Respiratory
Syndrome (P.R.R.S.), a commencé à être individualisée, chez
le porc, en 1986 aux Etats-Unis et en 1990 en Europe. Cette
maladie se traduit essentiellement chez le porc, par des
25 signes d'abattement, une anorexie, et une hyperthermie de
l'ordre de 40°C, que l'on observe classiquement sur les
truies dans les élevages atteints par la maladie. Ces
signes sont accompagnés ou suivis de troubles de la
reproduction (mises bas précoces ou tardives et naissance
30 de porcelets mort-nés, momifiés ou chétifs et retours en
chaleurs des truies). Un syndrome respiratoire peut être
observé chez les porcelets avec des lésions de pneumonie
interstitielle. Des porcs plus âgés peuvent également être
atteints de troubles respiratoires. Toute cette
35 symptomatologie peut être accompagnée de maladies

provoquées par des infections occasionnelles classiquement observées chez le porc.

Dans G. Wensvoort et al., Mystery Swine Disease in the Netherlands : the isolation of Lelystad virus, The
5 Veterinary Quarterly, Vol. 13, N° 3, 19 juillet 1991, on décrit l'isolation d'un agent associé à la maladie dite Mystery Disease, qui est caractérisé comme un virus, désigné Lelystad virus, et qui est présenté comme l'agent causal de la maladie. Cette découverte pouvait constituer
10 un premier pas pour la recherche d'un vaccin contre cette maladie.

Un procédé de production industrielle de ce virus ou d'antigène de ce virus n'était pas disponible, la culture ne paraissant possible que sur les macrophages alvéolaires
15 du porc.

Or, les inventeurs ont réussi à isoler et à identifier un autre virus, responsable de cette maladie. Ce virus est de type Myxovirus, selon l'analyse réalisée au microscope électronique, et a comme caractéristique de ne pas être
20 neutralisé par des sérums antigrippe porcine H1N1 et H3N2.

Une souche de ce virus identifiée sous la désignation P129-294 a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes tenue à l'Institut Pasteur sous le n° I-1153.

25 Dans la demande de brevet français n° 91 13338 déposée le 29 octobre 1991, les inventeurs ont décrit un procédé d'isolement du virus et son utilisation pour la préparation d'antigènes, un procédé de production industrielle de ce virus, ainsi que les vaccins réalisés à partir des
30 antigènes précités contenant une quantité vaccinante efficace d'antigènes, dans des véhicules convenables.

Or, parallèlement à la découverte et à l'utilisation de cet autre virus, dont une souche a été déposée sous la désignation P129-294, les inventeurs ont isolé, à partir du
35 même organe de la même truie provenant d'un élevage de porc

d'Allemagne et identifiée sous le n° 294, un virus tout à fait différent, dont une souche identifiée sous la désignation P129-294B. Ils ont également isolé une autre souche virale à partir d'organes d'un porcelet d'un élevage d'Allemagne, prélevés le 13 février 1991, cette souche étant identifiée sous la désignation P120-117B.

Les inventeurs ont pu établir que les deux virus, à savoir le virus de type Myxovirus (par exemple P129-294), ci-après désigné virus A, et les virus correspondants aux souches P129-294B ou P120-117B, ci-après appelé virus B, se retrouvent associés dans les prélèvements effectués à partir de porcs malades ou infectés et dans les mêmes organes, et peuvent être considérés comme agents conjoints responsables de la maladie dite Mystery Disease.

La présente invention a donc pour objet un procédé d'isolement des virus B et son utilisation pour la préparation d'antigènes.

Un procédé isolant un virus B peut comporter le passage sur des macrophages de poumon de porc ou péritonéaux.

Dans un mode de mise en oeuvre perfectionné de l'invention, l'isolement du virus B peut être combiné à l'isolement du virus A dans un même procédé d'isolement. Des procédés d'isolement comportent le prélèvement d'organes d'animaux malades ou infectés, ou de sang, des passages de surnageants d'organes broyés ou de constituants du sang sur des cellules sensibles hétérologues ou homologues, telles que notamment des cellules primaires de porc, des cellules de lignée porcine ou hétérologue, telles que les cellules de la lignée Vero, MDCK (en présence de trypsine), ST, BHK.

On préfère effectuer le prélèvement à partir de poumon d'animal infecté ou encore d'un pool d'organes comprenant, par exemple, coeur, rate, foie, rein et tissus lymphoïdes.

Les récoltes virales n'héماغglutinent pas les globules rouges de poule, sont sensibles au chloroforme, réagissent

avec des sérums convalescents provenant d'élevages infectés comme il a été démontré par immunofluorescence indirecte. La structure en microscopie électronique démontre des structures enveloppées d'une grandeur d'environ 50 nm.

5 L'invention a également pour objet un procédé de production industrielle du virus B et, de préférence, simultanément du virus A, sur des cellules sensibles hétérologues ou homologues, telles que les cellules de la lignée Vero, MDCK, ST, BHK, macrophages primaires ou
10 lignées, cellules primaires ou de lignée d'origine pulmonaire ou embryonnaire. Le virus peut être utilisé pour la préparation d'antigènes.

Le procédé de production industrielle du virus A, décrit dans la demande de brevet français précitée avait,
15 de façon remarquable, produit simultanément le virus B.

Le virus, ou le mélange de virus, récolté peut être utilisé pour la préparation d'antigènes. A cette fin, il est, de préférence, convenablement purifié selon des procédures usuelles, par exemple l'ultra-centrifugation ou
20 la chromatographie. Il peut également être concentré par les techniques usuelles.

Selon l'utilisation envisagée, les préparations d'antigènes selon l'invention peuvent être constituées de particules virales vivantes, atténuées ou non, de
25 particules inactivées, d'antigènes de sous-unités ou encore d'antigènes obtenus par recombinaison génétique à partir de gènes du ou des virus isolés, insérés pour être exprimés dans le génome d'hôtes recombinants procaryotes ou eucaryotes.

30 L'invention a également pour objet les vaccins réalisés à partir d'au moins un des antigènes précités, contenant une quantité vaccinante efficace d'antigènes, dans des véhicules convenables.

De préférence, les vaccins selon l'invention comportent
35 les antigènes du virus A, en association avec des antigènes

de virus B, et éventuellement d'autres antigènes infectieux pour l'immunisation du porc ou d'autres espèces animales.

Ces vaccins peuvent être prévus pour être administrés aux porcs mais également à d'autres animaux qui pourraient s'avérer sensibles à ce virus.

Un vaccin atténué peut être préparé par passages du virus sur culture cellulaire.

La quantité de chaque virus par dose vaccinale est de préférence comprise entre 10^3 et 10^8 DICC₅₀ par dose.

10 Le vaccin atténué vivant peut être présenté sous forme liquide ou lyophilisée en présence de stabilisateurs de formulations très variées, pouvant inclure des sucres, des protéines et des tampons. Le vaccin peut être adjuvé à l'aide d'adjuvants minéraux ou organiques.

15 Le vaccin vivant peut être administré à des animaux pour les protéger dès le début de la période d'engraissement ou avant l'insémination artificielle ou la saillie, ou au cours de la gestation, en une et de préférence en deux injections à trois ou quatre semaines
20 d'intervalle.

Un vaccin inactivé peut être préparé à partir de suspensions virales obtenues par passages sur des systèmes cellulaires homologues (porcin) ou hétérologues, puis inactivation par des agents inactivants chimiques usuels
25 tels que la Béta-propiolactone, des enzymes ou des solvants organiques ou des détergents. L'inactivation peut également être obtenue par action physique tels que rayonnement ultra-violet, irradiations gamma ou rayons X. L'agent inactivant peut être neutralisé si nécessaire.

30 Le vaccin inactivé contient de préférence au moins l'équivalent de 10^5 DICC₅₀ de chaque virus par dose vaccinale, concentration déterminée avant inactivation.

Le vaccin inactivé peut être administré aux animaux pour les protéger dès le début de la période
35 d'engraissement, ou avant l'insémination artificielle ou la

saillie, ou en cours de gestation, en une et de préférence deux injections à trois ou quatre semaines d'intervalle. On préfère que le vaccin contienne un adjuvant d'origine minérale ou organique.

5 Un vaccin recombinant peut être obtenu, par exemple, par insertion de la séquence codant pour l'antigène recherché du virus dans le génome de l'hôte. L'hôte peut être un virus, notamment pour la réalisation d'un vaccin vivant.

10 Cet hôte peut également être un système bactérien, de levure, ou d'autres cellules eucaryotes. Dans ce cas, l'hôte est de préférence utilisé pour la production d'antigènes qui sont ensuite purifiés et conditionnés pour faire le vaccin.

15 Le vaccin peut être présenté sous forme monovalente ou associé à d'autres agents viraux ou bactériens responsables de maladies chez le porc.

L'invention a également pour objet des préparations d'antigènes à fin de diagnostic, caractérisées en ce
20 qu'elles comportent des antigènes de virus A ou un mélange d'antigènes de virus A et B. Ces préparations d'antigènes à fin de diagnostic sont réalisées de façon usuelle et comprennent les moyens usuels permettant l'identification et éventuellement la quantification des réactions
25 sérologiques positives.

L'invention a également pour objet les préparations d'anticorps contre ces antigènes, utilisables pour le diagnostic de la maladie.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention
30 apparaîtront à la lecture de la description suivante, faite à titre d'exemple non limitatif.

Exemple 1 : Isolement du virus P129-294B.

Des prélèvements de poumon ont été réalisés sur une
35 truie provenant d'un élevage de porcs d'Allemagne et

identifiée sous le n° 294.

a) Méthode :

Broyats d'organes : chaque prélèvement est broyé individuellement dans milieu MEM + antibiotiques.

- 5 Dilution : poids organe par volume d'environ 1 pour 10.
Centrifugation clarifiante pour récupération du liquide surnageant (LS).

Filtration à 0,22 μ .

b) Essais sur cultures cellulaires :

- 10 Premiers passages : le LS est inoculé sur couche cellulaire établie de macrophages de poumon de porc SPF. Trois jours après inoculation, il a été observé un effet cytopathique se manifestant par une modification morphologique des macrophages, à différents stades
15 d'évolution. Cet effet cytopathique est maximal le cinquième jour.

- Examen en microscopie électronique : méthode sur coupes de macrophages infectés et sains. Les macrophages infectés présentent un aspect totalement différent des macrophages
20 sains. On note à l'intérieur des cellules infectées des vacuoles contenant des particules d'environ 50 nm.

Exemple 2 : Isolement du virus P120-117B des organes d'un porcelet prélevé le 13 février 1991.

25 a) Méthode :

Broyats d'organes : l'organe est broyé dans du milieu MEM plus antibiotiques.

Dilution : poids de l'organe par volume d'environ 1 pour 10.

- 30 Centrifugation clarifiante pour récupération du liquide surnageant (LS).

Filtration à 0,22 μ .

b) Essais sur cultures cellulaires :

- Premiers passages : le LS est inoculé sur couche
35 cellulaire établie de macrophages de poumon de porc SPF.

Trois jours après inoculation, il a été observé un effet cytopathique se manifestant par une modification morphologique des macrophages, à différents stades d'évolution. Cet effet cytopathique est maximal le

5 cinquième jour.

Exemple 3 : Etude sérologique.

Les antigènes constitués par les préparations virales P129/294 B et P120/177 B, ainsi que par deux autres souches

10 virales P 206 et P 208 ont été testés vis-à-vis :

- d'un sérum de référence usuel, dit de Ploufragan ;
- de sérums de truies ayant servi à la reproduction expérimentale de la maladie (prélèvement 21 jours après inoculation et après la mise-bas de truies) ;
- 15 - des sérums de porcelets inoculés expérimentalement par voie intranasale.

Ce bilan sérologique par réaction d'immunofluorescence indirecte est le suivant :

20		P129/294 B	P120/117 B	P206 ou P 208
25	Sérums Ploufragan	+	+	+
30	Sérums truies	+	-	-
	Sérums porcelets	-	+	+

35 **Exemple 4 : Etude du pouvoir pathogène comparé des deux virus : P129-294 et P129-294B.**

a) La souche virale P129-294 : l'agent viral isolé sur oeufs a été inoculé sous forme d'une suspension virale de liquide allantoidien du troisième passage, à 2 porcs SPF,

40 par voie intraveineuse, sous un volume de 1 cm³. 2 autres

porcs SPF ont été inoculés également par voie intraveineuse avec du virus Newcastle, souche Texas. 2 porcs ont été conservés comme témoins et inoculés avec du liquide allantoïdien non dilué. Les animaux étaient stabulés dans des boxes différents. Ils ont été observés durant 14 jours avec prise de température quotidienne et pesée aux jours 0 et 7. Des prélèvements de sang ont été réalisés aux jours 0 et 14.

Les 2 porcs inoculés avec l'agent hémagglutinant ont présenté une hyperthermie comprise entre 39°5 et 40°C entre le jour 1 après inoculation et le jour 7, alors que les 4 autres porcs n'ont jamais présenté cette élévation de température. Il a été noté, au jour 2, des traces de vomissement dans le box des 2 porcs inoculés avec l'agent hémagglutinant. D'autre part, une inappétence de quelques jours a été observée chez ces 2 animaux, ce qui s'est traduit par une évolution pondérale très nettement défavorable pour ces 2 animaux par rapport à ceux inoculés soit avec liquide allantoïdien témoin, soit avec du virus de Newcastle. Le graphique ci-après illustre cette différence de croissance. A l'autopsie, l'un des 2 porcs inoculés avec l'agent hémagglutinant présentait des lésions peu marquées de pneumonie.

b) La souche virale P129-294B a été inoculée à 2 truies, par voie nasale, avec $10^{3,5}$ doses infectieuses de l'isolat aux 58ème et 66ème jours de la gestation. Les truies n'ont présenté aucun signe clinique de maladie après inoculation. Au jour 110 de la gestation, la truie n°25 a mis bas de 2 porcelets morts-nés et de 8 porcelets vivants. Les vivants avaient un aspect chétif et étaient incapables de marcher. Leur comportement ressemblait exactement à celui observé chez des porcelets dans les élevages infectés. 3 porcelets sont morts le jour de la mise bas, 2 à 24 heures, 3 à 72 heures et, enfin, 1 porcelet a été trouvé mort à 72 heures après mise bas tardive. A ce jour,

la deuxième truie, en gestation plus précoce, à présenté fièvre et anorexie au jour 106 de gestation. A 112 jours de gestation, elle a mis bas 5 porcelets morts-nés et un porcelet vivant très chétif.

5

Conclusion : Le virus P129-294 est responsable de signes cliniques sur des porcelets, apparaissant sous forme d'hyperthermie et d'anorexie, alors que le virus P129-294B est responsable de troubles de la reproduction. Cet ensemble clinique reproduit les observations faites dans les élevages infectés. Enfin, ces deux virus ont été isolés du même organe, le poumon, d'une même truie.

Exemple 5 : Etude du pouvoir pathogène du virus
15 120/117 B.

Une inoculation expérimentale réalisée sur des porcelets d'un poids de 20 kg environ, à l'aide de la souche P120/117 B, administrée par voie intranasale avec un inoculum titrant $10^{5,5}$ DICC₅₀/ml entraîne une fièvre et une
20 inappétence pendant quelques jours.

Exemple 6 : Suivi sérologique. Présence d'anticorps contre la souche P129-294.

238 sérums provenant d'élevages infectés ont été
25 examinés pour la présence d'anticorps vis-à-vis de la souche P129-294.

Dans ces élevages, des signes manifestes de maladie mystérieuse du porc ont été observés (avortements, problèmes respiratoires). La méthode sérologique est un
30 test Elisa indirect ; l'antigène utilisé est un antigène obtenu sur oeufs après ultracentrifugation. Les sérums à tester sont traités au préalable à l'aide d'un antigène oeuf négatif ayant subi le même traitement
d'ultracentrifugation. Les 238 sérums provenant d'élevages
35 infectés d'Allemagne, de Belgique ou de Hollande,

présentent des anticorps très positifs pour 43 % d'entre eux, faiblement positifs pour 37 % et négatifs pour 20 %.

Conclusion : Dans les cas cliniques de maladie
5 mystérieuse, on observe une sérologie positive contre la souche P129-294 dans 80 % des cas. Il faut remarquer que des sérums provenant d'élevages non suspects, sont négatifs, ou que la fréquence de positivité est
10 significativement inférieure à celle observée dans les élevages cliniquement atteints.

Ces résultats montrent l'importance de l'infection à Myxovirus dans le syndrome maladie mystérieuse.

Exemple 7 : Préparation de vaccin vivant.

15 Les virus P129-294 et P120-117B ou P129-294B sont multipliés par passages sur un ou des systèmes cellules adaptés. La récolte est traitée suivant le vaccin qui est
produit : vaccin lyophilisé pour reprise en solvant aqueux, en solvant huileux ou en d'autres vaccins. Il peut aussi
20 être présenté en vaccin liquide en solvant aqueux, huileux ou autre vaccin.

Exemple 8 : Préparation de vaccin inactivé.

Les virus P129-294 et P120-117B ou P129-294B sont
25 multipliés sur cellules BHK, Vero, macrophages, ou cellules de lignée porcine, et inactivés par la Béta-propiolactone, éthylène-imine, puis adjuvés avec un adjuvant aqueux ou huileux.

30 Les souches virales P120-117B et P129-294B ont été déposées auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) :

P120-117B déposée sous le n° I-1163

P129-294B déposée sous le n° I-1164.

35 Le virus P120-117B apparaît comme un togavirus.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'isolement de virus (B) ou de mélange de virus (A,B) de la Mystery Disease, comportant le prélèvement d'organes ou de sang de porcs malades ou infectés et des passages du surnageant de broyage ou de constituants du sang sur des cellules sensibles hétérologues ou homologues, puis la récolte du surnageant.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les passages sont effectués sur cellules de la lignée Vero, MDCK, ST, BHK.

3. Procédé de production industrielle de virus (B) ou de mélange de virus (A,B) de la Mystery Disease, dans lequel on cultive le virus sur des cellules sensibles homologues, notamment macrophages de poumon de porc ou péritonéaux, des cellules primaires de porcs, des cellules de lignée porcine, ou hétérologues, notamment des cellules de la lignée Vero, MDCK, ST, BHK, et l'on récolte le dernier surnageant.

4. Préparation d'antigènes viraux purifiés de virus (A) et de virus (B) de la Mystery Disease, comprenant des particules virales vivantes, atténuées ou non, ou des particules inactivées ou des antigènes de sous-unités ou des antigènes exprimés par recombinaison génétique à partir de gènes du virus isolé.

5. Préparation d'antigènes contenant des antigènes d'au moins une des souches virales : P 129-294 déposée à la CNCM sous le n° I-1153, P129-294B et P120-117B.

6. Vaccin contre la Mystery Disease, caractérisé en ce qu'il contient, dans un véhicule approprié, une quantité vaccinante d'un antigène selon l'une des revendications 4 et 5.

7. Vaccin atténué selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est préparé par passages du virus sur culture cellulaire.

8. Vaccin atténué selon la revendication 7, caractérisé

en ce que la quantité des virus respectifs par dose vaccinale est comprise entre 10^3 et 10^8 DICC₅₀.

9. Vaccin inactivé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le surnageant de culture est inactivé par un agent inactivant chimique ou physique.

10. Vaccin inactivé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il contient au moins l'équivalent de 10^5 DICC₅₀ des virus respectifs par dose vaccinale.

11. Préparation à usage de diagnostic de la maladie dite de la Mystery Disease, caractérisée en ce qu'elle comporte des antigènes selon l'une des revendications 4 et 5 ou des anticorps contre ces antigènes.

15

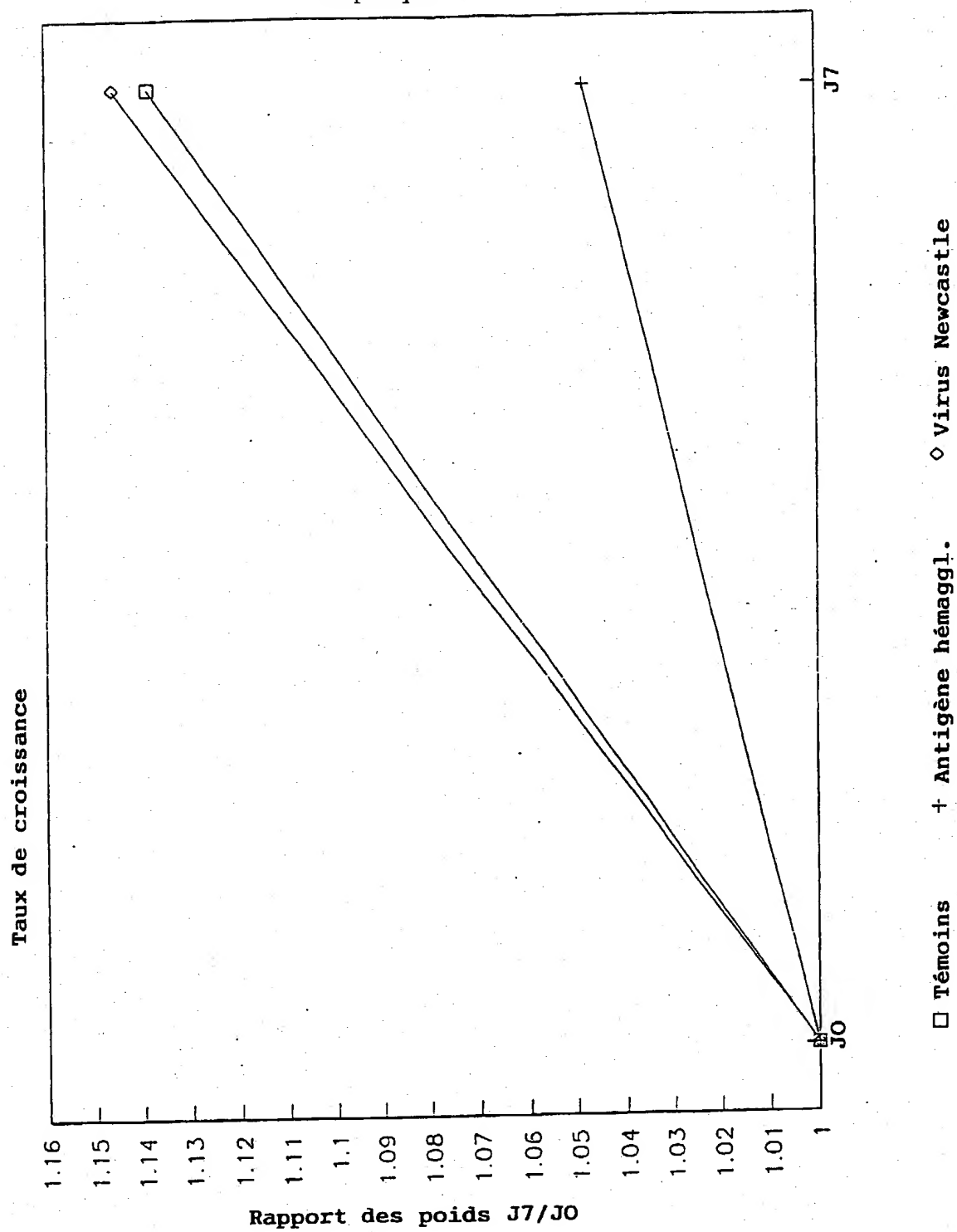
20

25

30

35

Graphique



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ : C12N 7/02 C12N 7/06 C12N 7/08 A61K 39 /12 G01N 33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ : C07K 15 C12N 7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PHIND Database, PJB Publications Ltd, (Surrey GB), abstract No.00278268, "Dutch team isolates mystery pig disease agent", & ANIMAL-PHARM 230, 21 June 1991, page 21	1,3,4,6,7,9, 11
Y	World Patents Index Latest, week 8741, AN=87-286929, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & JP, A, 62198626 (ZH BISEIBUTSU KAGAKU KEN) 2 September 1987, see abstract	3,4,6,9
Y	World Patents Index Latest, week 8113, AN=81-215210, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & DD, A, 145705 (SOLISCH P) 7 January 1981, see abstract	1
Y	World Patents Index Latest, week 8408, AN=84-044721, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & JP, A, 50052224 (SHIKENJOCHO K E) 9 May 1975, see abstract	7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 1993 (26.04.93)

Date of mailing of the international search report

28 June 1993 (28.06.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00026

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	World Patents Index Latest, week 9142, AN=91-308267, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & SU, A, 1604851 (UKR AGRIC. MICROBIOL.) 7 November 1990, see abstract	11
A	--- World Patents Index Latest, week 8432, AN=84-201354, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & WO-A-8402847 (AMGEN) 2 August 1984, see abstract	4
A	--- World Patents Index Latest, week 8325, AN=83-59978K, Derwent Publications Ltd, (London, GB), & JP, A, 58079929 (ZH BISEIBUTSU KAGAKU KEN) 13 May 1983, see abstract	1
T	--- PHIND Database, PJB Publications Ltd, (Surrey, GB), abstract No.00275332, "Bonn symposium seeks fresh clues to mystery pig disease", & ANIMAL-PHARM 228, 17 May 1991, P3	1
P,X	--- Medline Database, (Bathesda, US), abstract No. 92303912, E. ALBINE et al.: "An enzyme linked", & ANN. RECH. VET., 1992, 23(2), pages 167-76	4, 11
P,X	--- Medline Database, (Bathesda, US), abstract No. 92303911, T. BARON et al.: "Report on the first outbreaks", & ANN. RECH. VET., 1992, 23(2), pages 161-166	1
P,X	--- Medline Database, (Bathesda, US), abstract No. 92314095, D.A. BENFIELD et al.: "Characteri- zation of swine", & J. VET. DIAGN. INVEST., 1992, 4(2), pages 127-133	2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00026

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
Int.C1.5	C 12 N 7/02	C 12 N 7/06	C 12 N 7/08
A 61 K 39/12	G 01 N 33/569		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée ⁸			
Système de classification	Symboles de classification		
Int.C1.5	C 07 K 15	C 12 N 7	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹			
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰			
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³		No. des revendications visées ¹⁴
Y	PHIND Database, PJB Publications Ltd, (Surrey, GB), abrégé no. 00278268, "Dutch team isolates mystery pig disease agent", & ANIMAL-PHARM 230, 21 JUNI 1991, P21 ---		1,3,4,6 7,9,11
Y	World Patents Index Latest, semaine 8741, AN=87-286929, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & JP,A,62198626 (ZH BISEIBUTSU KAGAKU KEN) 2 septembre 1987, voir abrégé ---		3,4,6,9
Y	World Patents Index Latest, semaine 8113, AN=81-215210, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & DD,A,145705 (SOLISCH P) 7 janvier 1981, voir abrégé --- -/-		1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>			
IV. CERTIFICATION			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26-04-1993		28-06-1993	
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		D. GURDJIAN	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	World Patents Index Latest, semaine 8408, AN=84-044721, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & JP,A,50052224 (SHIKENJOCHO K E) 9 mai 1975, voir abrégé ---	7
Y	World Patents Index Latest, semaine 9142, AN=91-308267, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & SU,A,1604851 (UKR AGRIC. MICROBIOL.) 7 novembre 1990, voir abrégé ---	11
A	World Patents Index Latest, semaine 8432, AN=84-201354, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & WO-A-8402847 (AMGEN) 2 août 1984, voir abrégé ---	4
A	World Patents Index Latest, semaine 8325, AN=83-59978K, Derwent Publications Ltd, (Londres, GB), & JP,A,58079929 (ZH BISEIBUTSU KAGAKU KEN) 13 mai 1983, voir abrégé ---	1
T	PHIND Database, PJB Publications Ltd, (Surrey, GB), abrégé no. 00275332, "Bonn symposium seeks fresh clues to mystery pig disease", & ANIMAL-PHARM 228, 17 MAI 1991, P3 ---	1
P,X	Medline Database, (Bathesda, US), abrégé no. 92303912, E. ALBINE et al.: "An enzyme linked", & ANN. RECH. VET., 1992, 23(2), P167-76 ---	4,11
P,X	Medline Database, (Bathesda, US), abrégé no. 92303911, T. BARON et al.: "Report on the first outbreaks", & ANN. RECH. VET., 1992, 23(2), P161-6 ---	1
P,X	Medline Database, (Bathesda, US), abrégé no. 92314095, D.A. BENFIELD et al.: "Characterization of swine", & J. VET. DIAGN. INVEST., 1992, 4(2), p127-33 -----	2